



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
2-0002036

(51)⁷ **C08B 37/00, A61K 31/00**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00381

(22) 11.11.2015

(67) 1-2015-04327

(45) 27.05.2019 374

(43) 25.01.2016 334

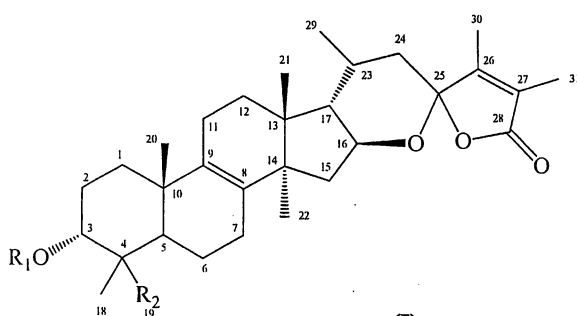
(73) **TRƯỜNG ĐẠI HỌC VINH (VN)**

Số 182 Lê Duẩn, thành phố Vinh, tỉnh Nghệ An

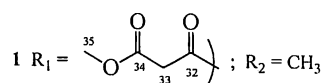
(72) **Trần Đình Thắng (VN), Tian Shung-Wu (TW), Ping-Chung Kuo (TW), Nguyễn Thị Bích Ngọc (VN), Tsong-Long Hwang (TW), Mei-Lin Yang (TW), Shih-Huang Tai (TW), E-Jian Lee (TW), Dai-Huang Kuo (TW), Nguyễn Huy Hùng (VN), Nguyễn Ngọc Tuấn (VN)**

(54) **PHƯƠNG PHÁP CHIẾT HỢP CHẤT HEXAGONIN TỪ LOÀI NẤM TỔ ONG LÔNG THÔ (HEXAGONIA APIARIA) VÀ HỢP CHẤT HEXAGONIN THU ĐƯỢC TỪ PHƯƠNG PHÁP NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp chiết các hợp chất hexagonin có công thức chung (I) từ loài nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria*). Giải pháp hữu ích còn đề cập đến hợp chất hexagonin có công thức (I) thu được từ quy trình theo sáng chế, một hợp chất thuộc lớp chất triterpenoit phân cực có phổ rộng dùng để phát triển thực phẩm chức năng kháng viêm.



(I)



2 R₁ = H; R₂ = CH₃

3 R₁ = Ac; R₂ = CH₃

4 R₁ = H; R₂ = CHO

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực sinh hóa và y dược, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp chiết hợp chất hexagonin từ loài nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria*) và các hợp chất hexagonin có hoạt tính sinh học dùng để phát triển thực phẩm chức năng kháng viêm.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Nấm đã được công nhận là một trong những nguồn tài nguyên đa dạng sinh học lớn nhất kể cả trên cạn và dưới nước. Chúng có vai trò sinh thái đặc biệt quan trọng đối với các hệ sinh thái trên cạn. Hiện nay, ước tính tổng số các loài nấm trên trái đất khoảng 1,5 triệu loài, trong khi số lượng nấm được mô tả trên toàn thế giới chỉ là khoảng 7% của con số này. Trong quá trình phát triển và sinh trưởng của các loài nấm lớn đã hình thành một cơ chế đặc biệt của sự trao đổi chất có thể sản sinh các chất chuyển hóa bậc hai sở hữu đa dạng các đặc tính khác nhau về cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học, để chống lại môi trường không thuận lợi và kết thúc sự tăng sinh tế bào, phân loại và toàn bộ chu kỳ sống để đạt mục đích tự vệ và sinh tồn, đồng thời cung cấp một nguồn tài nguyên phong phú và đa dạng cho việc phát triển các nguồn thuốc mới.

Đối với nấm tổ ong lông thô, hiện chưa có nghiên cứu nào về loài nấm này trên thế giới, đặc biệt là nghiên cứu về các hợp chất có đặc tính sinh học quý có trong nấm để phát triển nguồn dược liệu mới, thân thiện và an toàn cho người sử dụng. Với mục đích tạo cơ sở khoa học để có thể đánh giá đúng giá trị dược lý đích thực của nguồn tài nguyên nấm lớn, cũng như nhằm định hướng khai thác các hoạt chất có tiềm năng, các tác giả sáng chế đã đi sâu nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính kháng viêm đối tượng nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria*) mà chưa có bất kỳ một công trình nghiên cứu nào tiến hành trên thế giới. Dựa trên kết quả nghiên cứu, các tác giả đã phát hiện ra các hợp chất mới hexagonin có cấu trúc đặc biệt khi xuất hiện cacbon spiro tại C-25 rất hiếm gặp trong tự nhiên và lần đầu tiên được tìm thấy trong tự nhiên, bao gồm 4 hợp chất hexagonin bao gồm 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-

diepoxylanosta-8,26-dien-3-yl 3-oxobutanoat (hexagonin A), 3-hydroxy-26-methyl-16,25:25,26-diepoxylanosta-8,26-dien-28-on (hexagonin B), 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylanosta-8,26-dien-3-yl acetat (hexagonin C), và 3-hydroxy-26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylanosta-8,26-dien-19-al (hexagonin D) có hoạt tính sinh học. Các hợp chất mới này thuộc lớp chất triterpenoit phân cực, có phổ rộng các hoạt tính sinh học thú vị, như: gây độc tế bào, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, giảm đau. Tuy nhiên, việc phân lập các chất phân cực, đặc biệt là từ đối tượng nấm lớn, là rất khó khăn bởi nó đòi hỏi phải loại bỏ được các tạp chất phân cực khác. Do đó, trong giải pháp hữu ích này, ngoài việc tìm ra được các hợp chất có hoạt tính còn đề cập đến phương pháp chiết các hợp chất này từ loài nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria*).

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

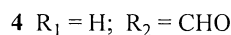
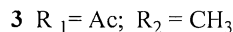
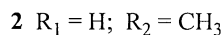
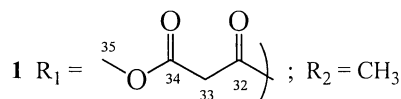
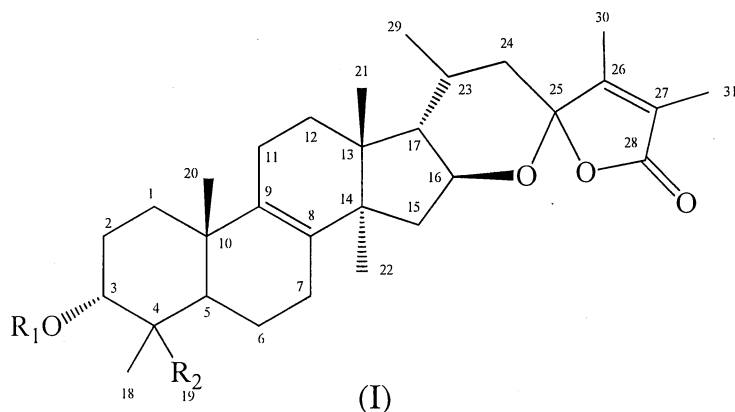
Giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp chiết hợp chất hexagonin và hợp chất hexagonin từ loài nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria*) có hoạt tính sinh học dùng để phát triển thực phẩm chức năng kháng viêm.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp chiết hợp chất mới hexagonin có công thức chung (I) từ nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria*), trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

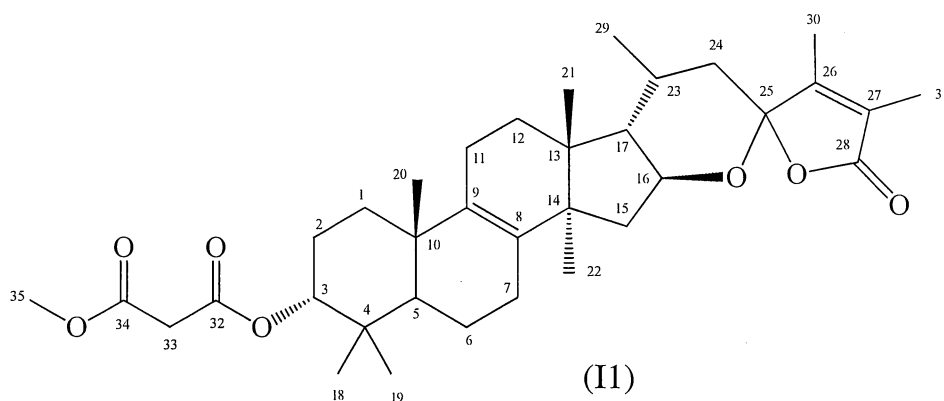
a) Tạo cao chiết nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria*) bằng cách thái nhỏ rồi ngâm chiết bằng metanol 3 lần theo tỷ lệ nguyên liệu (kg)/dung môi (lít) là 1/1 ở nhiệt độ phòng, sau đó lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm, thu được cao metanol dạng lỏng;

b) Tạo cao chiết phân đoạn etylaxetat bằng cách hòa tan cao metanol dạng lỏng vào nước và bổ sung một lượng etylaxetat tương ứng và khuấy đều, sau đó chưng cất chân không thu được cao etylaxetat;

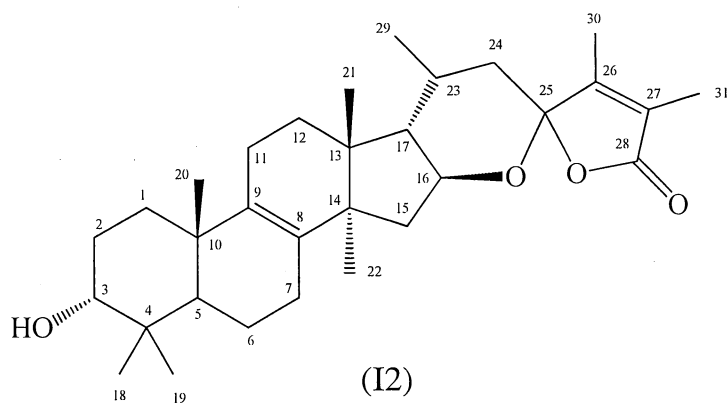
c) Sắc ký cao etylaxetat bằng cách đưa cao etylaxetat lên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải hexan-axeton với tỷ lệ lần lượt 100:0, 25:1, 15:1, 10:1, 7:1, 5:1 và hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ với tỷ lệ lần lượt 100:0, 6:1, 3:1, 2:1, 1:1, trong số 7 phân đoạn thu được, mỗi phân đoạn 250ml được ký hiệu từ F1-F7, thu ba phân đoạn chính F1, F3 và F4 chứa hợp chất hexagonin có công thức chung (I):



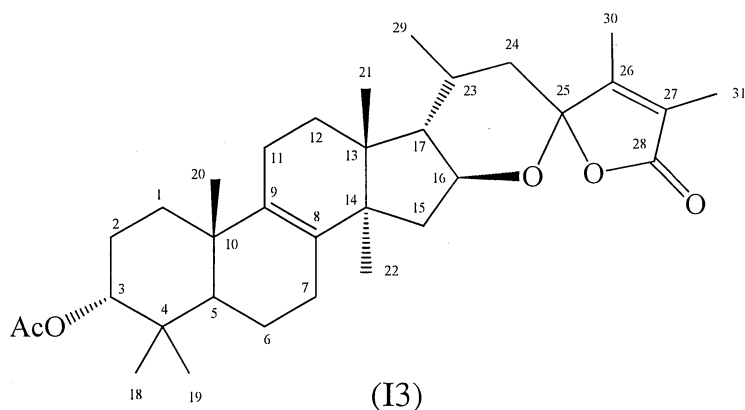
Theo một phương án của khía cạnh này, phương pháp theo giải pháp hữu ích còn bao gồm bước chiết hợp chất 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylnosta-8,26-dien-3-yl 3-oxobutanoat (hexagonin A) bằng cách đưa phân đoạn F1 lên cột kích thước 60x5 cm được nhồi 200g silica gel và rửa giải bằng hệ dung môi hexan:axeton với tỷ lệ lần lượt là 100:0, 25:1, 15:1, 10:1, 4:1, mỗi hệ dung môi 250ml, trong số 7 phân đoạn thu được, thu phân đoạn F1.7 và tiến hành sắc ký cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi giải hấp $CH_3OH:H_2O$, sau khi loại bỏ dung môi thu được 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylnosta-8,26-dien-3-yl 3-oxobutanoat (hexagonin A) có công thức (II) dạng bột không màu:



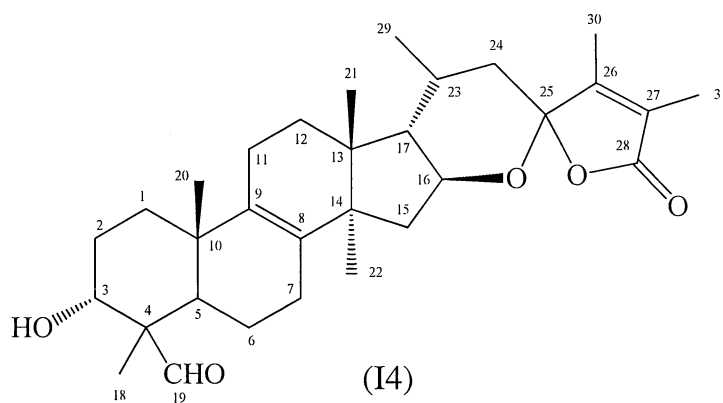
Theo một phương án khác của khía cạnh này, phương pháp theo giải pháp hữu ích còn bao gồm bước chiết hợp chất hexagonin B bằng cách đưa phân đoạn F3 lên cột silica gel kích thước 60x3,2 cm được nhồi 200 g silica gel và rửa giải bằng hệ dung môi Hexan:axeton với tỷ lệ lần lượt 9:1, 6:1, 4:1 và 1:1, mỗi hệ dung môi sử dụng 250ml, trong đó thu phân đoạn F3.2 và tiến hành sắc ký cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi giải hấp $CH_3OH:H_2O$, sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-16,25:25,26-diepoxylnosta-8,26-dien-28-on (hexagonin B) có công thức (I2) dạng bột không màu:



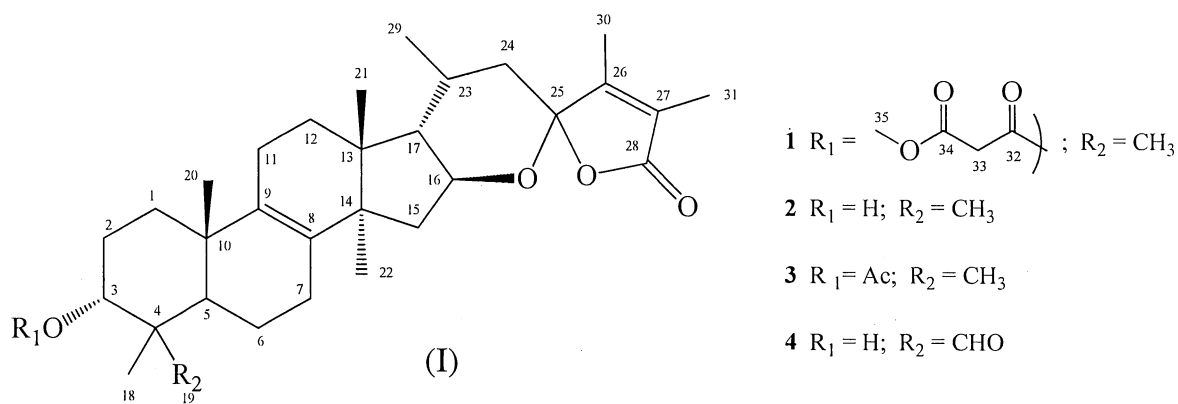
Theo một phương án khác của khía cạnh này, phương pháp theo giải pháp hữu ích còn bao gồm bước chiết hợp chất 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylanosta-8,26-dien-3-yl acetat (hexagonin C) bằng cách đưa phân đoạn F1 lên cột kích thước 60x5 cm được nhồi 200g silica gel và rửa giải bằng hệ dung môi hexan:axeton với tỷ lệ lần lượt là 100:0, 25:1, 15:1, 10:1, 4:1, mỗi hệ dung môi 250ml, trong số 7 phân đoạn thu được, thu phân đoạn F1.6, tiếp đó sắc ký cột với hệ dung môi rửa giải hexan:axeton với tỷ lệ lần lượt 100:0, 25:1, 15:1, 10:1 và 4:1, sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất hexagonin C có công thức (I3) dạng bột không màu:



Theo một phương án khác của khía cạnh này, phương pháp theo giải pháp hữu ích còn bao gồm bước chiết hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylanosta-8,26-dien-19-al (hexagonin D) bằng cách đưa phân đoạn F4 lên cột có kích thước 60x5 cm được nhồi 200 g silica gel và rửa giải với hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ với tỷ lệ lần lượt là 20:1, 10:1, 6:1, 4:1, 2:1, mỗi hệ sử dụng 200 ml, trong đó thu phân đoạn F4.1 và tiến hành sắc ký cột silica gel (200 gam, 60 x 3 cm) rửa giải bằng hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$, sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylanosta-8,26-dien-19-al (hexagonin D) có công thức (I4) dạng bột không màu:

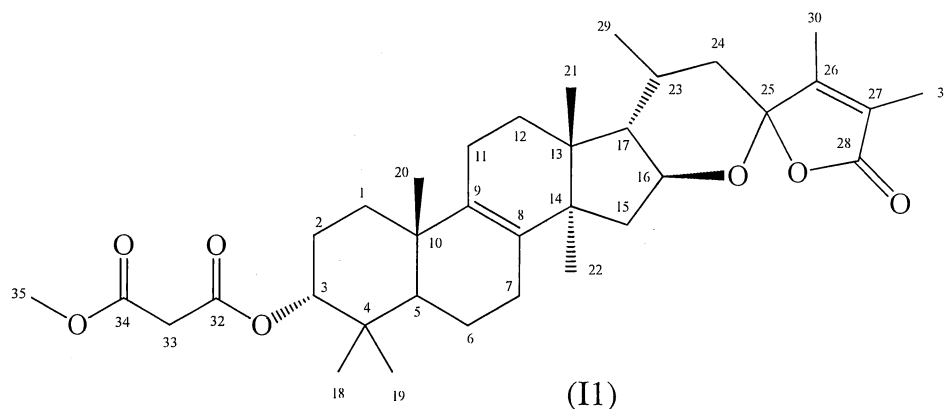


Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến các hợp chất hexagonin thu được bằng phương pháp theo giải pháp hữu ích, trong đó hợp chất này có công thức (I) chung:

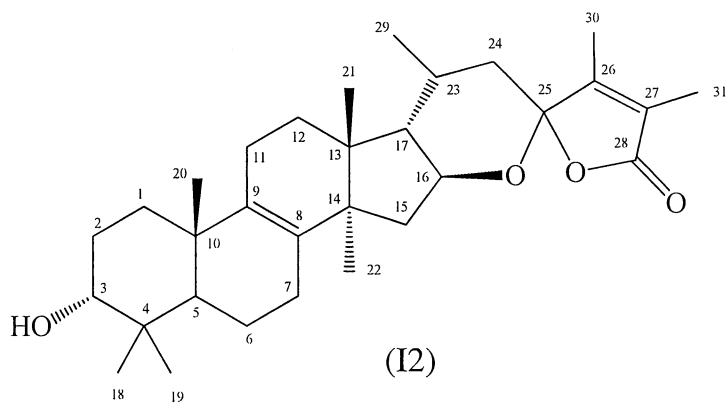


trong đó, R_1 được chọn từ nhóm bao gồm , H và Ac; và R_2 được chọn từ nhóm bao gồm CH_3 và CHO.

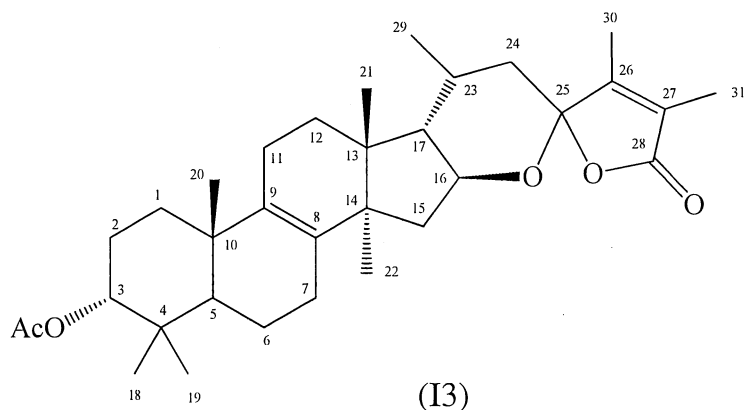
Theo một phương án của khía cạnh này, giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất hexagonin thu được bằng phương pháp theo giải pháp hữu ích, trong đó hợp chất này là 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-3-yl 3-oxobutanoat (hexagonin A) có công thức (II):



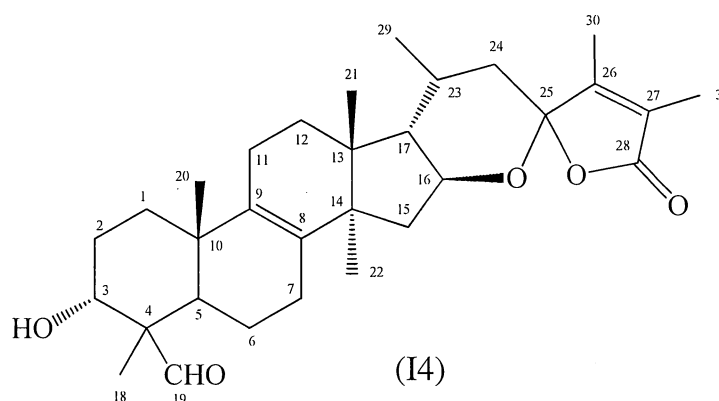
Theo một phương án của khía cạnh này, giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất hexagonin thu được bằng phương pháp theo giải pháp hữu ích, trong đó hợp chất này là 3-hydroxy-26-methyl-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-28-on (hexagonin B) có công thức (I2):



Theo một phương án của khía cạnh này, giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất hexagonin thu được bằng phương pháp theo giải pháp hữu ích, trong đó hợp chất này là 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-3-yl acetat (hexagonin C) có công thức (I3):



Theo một phương án của khía cạnh này, giải pháp hữu ích đề cập đến hợp chất hexagonin thu được bằng phương pháp theo giải pháp hữu ích, trong đó hợp chất này là 3-hydroxy-26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-19-al (hexagonin D) có công thức (I4):



Các hợp chất hexagonin thu được từ loài nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria*) bằng quy trình theo giải pháp hữu ích được dùng để phát triển thực phẩm chức năng kháng viêm.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả một cách chi tiết với các phương án minh họa cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả giải pháp hữu ích chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria* (Pers.) Fries) được dùng trong phương pháp theo giải pháp hữu ích thuộc chi *Hexagonia* Fr., họ Polyporaceae. Nấm một năm, mọc đơn, không có cuống, kích thước: dài khoảng 11 cm, rộng 8 cm và dày 2cm. Mũ nấm tròn hoặc hình bán nguyệt, bề mặt hơi lõm, có các vòng đồng tâm, tạo thành rãnh, màu vàng. Lỗ chân lông lục giác, dài khoảng 1cm, màu vàng nâu khi già có màu xám nâu, rộng 2-5 mm, thường lớn hơn ở trung tâm. Hệ sợi có ba dạng, tạo sinh sợi nấm trong suốt, nhiều nhánh, rộng 1,5-2,2 mm. Sợi nấm xương chiếm ưu thế trong quả thể. Bào tử hình trụ, trong suốt, mịn màng, kích thước 11-15 x 4,5-6 μ m. Mọc trên các loài gỗ rụng lá, gây chết cây chủ. Phân bố ở châu Á, được biết đến ở Ấn Độ, phía đông Trung Quốc, Philippin, và một số đảo ở Thái Bình Dương và tại Úc.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp chiết hợp chất hexagonin từ nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria*), trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) chiết nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria*); b) chiết phân bố bằng etylaxetat; và c) sắc ký cao etylaxetat để thu được hợp chất hexagonin có công thức chung (I).

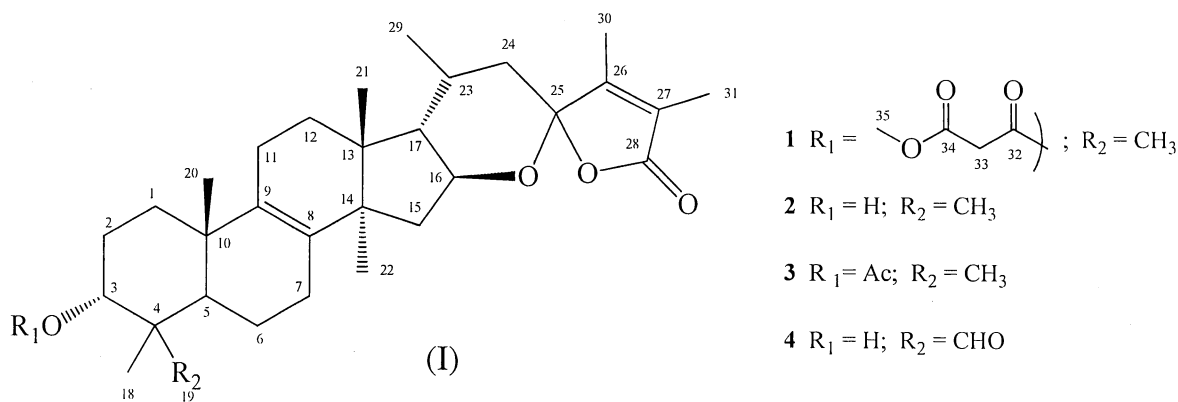
Trong bước chiết nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria*), nấm tổ ong lông thô được thu hái, sau đó thái nhỏ rồi ngâm chiết bằng metanol 3 lần theo tỷ lệ nguyên

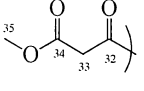
liệu (kg)/dung môi (lít) là 1/1 ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp đó lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm, thu được cao metanol dạng lỏng.

Trong bước chiết phân bố bằng etylaxetat, phần cao metanol dạng lỏng thu được ở trên được hòa tan vào nước, tiếp đó bổ sung một lượng etylaxetat tương ứng với lượng nước. Sau khi khuấy đều để chiết phần hợp chất tan trong dung môi etyl axetat. Sau đó, chưng cất chân không thu được phần cao etylaxetat.

Trong bước sắc ký cao etylaxetat, phần cao etyl axetat thu được ở trên được đưa lên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải hexan-axeton với tỷ lệ lần lượt 100:0, 25:1, 15:1, 10:1, 7:1, 5:1 và hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ với tỷ lệ lần lượt 100:0, 6:1, 3:1, 2:1, 1:1. Kết quả thu được 7 phân đoạn, mỗi phân đoạn 250 ml được đánh số ký hiệu từ F1 đến F7 tương ứng. Trong đó ba phân đoạn chính F1, F3 và F4 được xác định là chứa hợp chất hexagonin có công thức chung (I).

Các hợp chất hexagonin có công thức chung (I) theo giải pháp hữu ích có công thức cấu tạo đặc biệt rất hiếm gặp trong tự nhiên khi xuất hiện cacbon sipro tại vị trí C-25 như sau:

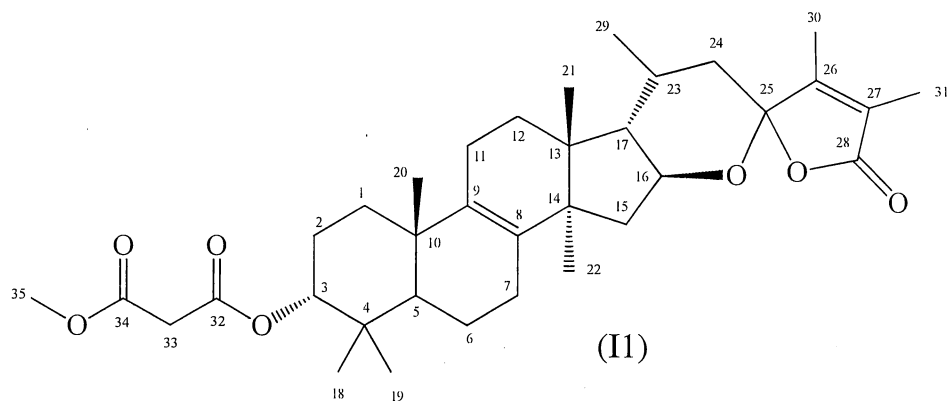


trong đó, R_1 được chọn từ nhóm bao gồm , H và Ac; và R_2 được chọn từ nhóm bao gồm CH_3 và CHO.

Hợp chất hexagonin có công thức chung (I) theo giải pháp hữu ích bao gồm 4 hợp chất hexagonin tương ứng. Đây là các hợp chất có cấu trúc rất đặc biệt, hiếm gặp trong tự nhiên khi xuất hiện cacbon sipro tại vị trí C-25. Do đó, theo các phương án khác nữa, giải pháp hữu ích đề cập đến đến phương pháp chiết các hợp chất 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-3-yl 3-oxobutanoat (hexagonin A), 3-hydroxy-26-methyl-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-28-on (hexagonin B),

26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-3-yl acetat (hexagonin C) và 3-hydroxy-26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-19-al (hexagonin D) tương ứng.

Theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp chiết hợp chất 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-3-yl 3-oxobutanoat (hexagonin A) từ các phân đoạn hợp chất hexagonin, trong đó phương pháp này bao gồm các bước chiết các phân đoạn chứa hexagonin được đề cập ở trên, tiếp đó, phân đoạn F1 lên cột kích thước 60x5 cm được nhồi 200g silica gel và rửa giải bằng hệ dung môi Hexan:axeton với tỷ lệ lần lượt là 100:0, 25:1, 15:1, 10:1, 4:1, mỗi hệ dung môi 250ml, trong số 7 phân đoạn thu được, thu phân đoạn F1.7 và tiến hành sắc ký cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi giải hấp $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$, sau khi loại bỏ dung môi thu được 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-3-yl 3-oxobutanoat (hexagonin A) có công thức (I1) dạng bột không màu:



Hợp chất 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-3-yl 3-oxobutanoat (hexagonin A) thu được theo giải pháp hữu ích có đặc tính hóa lý như sau:

Tên theo IUPAC: 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-3-yl 3-oxobutanoat:

Bột không màu (CHCl_3); Đ.n.c 184-185°C; $[\alpha]_D^{25} +57$ ($c = 0,6$, MeOH);

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 262 (2,65) nm;

IR (KBr) ν_{max} 2946, 1759, 1693, 1455, 1376, 1256, 1219, 1156 cm^{-1} ;

ESI-MS m/z 621 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 60), 605 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 26), 521 (33), 505 (100), 483 (48);

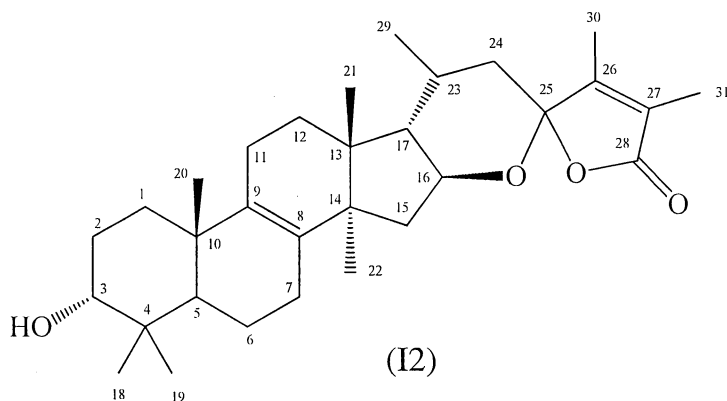
HR-ESI-MS m/z 605,3451 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (theo tính toán $\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{O}_7\text{Na}$ m/z 605,3454).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 4,71 (1H, *br s*, H-3), 4,32 (1H, *ddd*, $J = 11,5, 11,5, 5,0$ Hz, H-16), 3,72 (3H, *s*, CH_3 -35), 3,40 (2H, *s*, CH_3 -33), 2,27 (1H, *dd*, J

= 14,0, 11,5 Hz, H-15), 2,18 (1H, *m*, H-23), 2,05 (2H, *m*, H-11), 1,94 (3H, *d*, $J = 0,5$ Hz, CH₃-30), 1,89 (1H, *m*, H-2), 1,84 (1H, *m*, H-12), 1,81 (3H, *d*, $J = 0,5$ Hz, CH₃-31), 1,71 (1H, *m*, H-2), 1,60 (3H, *m*, H-7, -12, -24), 1,49 (3H, *m*, H-1, -7, -24), 1,41 (3H, *m*, H-1, -5, -17), 1,20 (1H, *dd*, $J = 14,0, 5,0$ Hz, H-15), 1,08 (3H, *s*, CH₃-22), 1,00 (3H, *s*, CH₃-20), 0,95 (3H, *d*, $J = 6,5$ Hz, CH₃-29), 0,93 (3H, *s*, CH₃-19), 0,88 (3H, *s*, CH₃-18), 0,68 (3H, *s*, CH₃-21);

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 172,2 (C-28), 167,2 (C-34), 165,9 (C-32), 157,4 (C-26), 135,1 (C-9), 133,8 (C-8), 125,2 (C-27), 108,2 (C-25), 79,8 (C-16), 79,6 (C-3), 54,6 (C-17), 52,3 (C-35), 48,6 (C-14), 45,3 (C-5), 43,5 (C-13), 41,8 (C-33), 41,1 (C-24), 37,1 (C-10), 36,8 (C-4), 35,4 (C-15), 30,7 (C-23), 30,5 (C-1), 30,1 (C-12), 28,0 (C-22), 27,6 (C-18), 26,5 (C-6), 23,1 (C-2), 21,7 (C-19), 20,2 (C-11), 19,4 (C-29), 18,8 (C-20), 17,9 (C-7), 16,5 (C-21), 10,8 (C-30), 8,5 (C-31).

Theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp chiết hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-28-on (hexagonin B) từ các phân đoạn hợp chất Hexagonin, trong đó phương pháp này bao gồm các bước chiết các phân đoạn chứa Hexagonin được đề cập ở trên bằng cách đưa phân đoạn F3 lên cột silica gel kích thước 60×3,2 cm được nhồi được nhồi 200 g silica gel và rửa giải bằng hệ dung môi Hexan:axeton với tỷ lệ lần lượt 9:1, 6:1, 4:1 và 1:1, mỗi hệ dung môi sử dụng 250ml, trong đó thu phân đoạn F3.2 và tiến hành sắc ký cột pha đảo RP -18 với hệ dung môi giải hấp CH₃OH:H₂O, sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-28-on (hexagonin B) có công thức (I2) dạng bột không màu:



Hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-28-on thu được theo giải pháp hữu ích có đặc tính hóa lý như sau:

Tên theo IUPAC: 3-hydroxy-26-methyl-16,25:25,26-diepoxylnosta-8,26-dien-28-on:

Bột không màu (CHCl_3); Đ.n.c $214-215^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} +66$ ($c = 0,2$, MeOH);

UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 247 (2,35) nm;

IR (neat) ν_{max} 3501, 2941, 1756, 1456, 1375, 1256, 1218, 1156 cm^{-1} ;

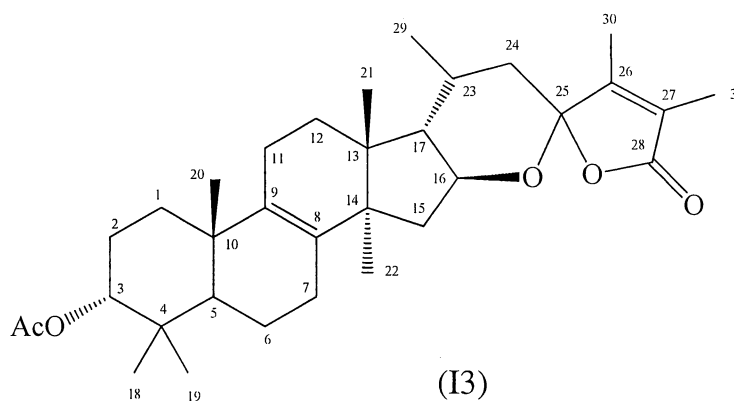
ESI-MS m/z 505 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100), 483 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 86);

HR-ESI-MS m/z 505,3290 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (theo tính toán $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_4\text{Na}$ m/z 505,3294);

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 4,32 (1H, *ddd*, $J = 11,5, 11,5, 5,0$ Hz, H-16), 3,43 (1H, *br s*, H-3), 2,26 (1H, *dd*, $J = 14,0, 11,5$ Hz, H-15), 1,94 (3H, *d*, $J = 0,5$ Hz, CH_3 -30), 1,81 (3H, *d*, $J = 0,5$ Hz, CH_3 -31), 1,19 (1H, *dd*, $J = 14,0, 5,0$ Hz, H-15), 1,06 (3H, *s*, CH_3 -22), 0,99 (3H, *s*, CH_3 -20), 0,97 (3H, *s*, CH_3 -19), 0,95 (3H, *d*, $J = 6,0$ Hz, CH_3 -29), 0,88 (3H, *s*, CH_3 -18), 0,68 (3H, *s*, CH_3 -21);

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 172,3 (C-28), 157,5 (C-26), 135,3 (C-9), 133,5 (C-8), 125,2 (C-27), 108,2 (C-25), 79,7 (C-16), 76,0 (C-3), 54,6 (C-17), 48,6 (C-14), 44,2 (C-5), 43,5 (C-13), 41,1 (C-24), 37,6 (C-10), 37,2 (C-4), 35,4 (C-15), 30,7 (C-23), 30,2 (C-1), 29,9 (C-12), 28,0 (C-22), 28,0 (C-19), 26,6 (C-6), 25,7 (C-2), 22,2 (C-18), 20,2 (C-11), 19,4 (C-29), 18,8 (C-20), 18,1 (C-7), 16,5 (C-21), 10,8 (C-30), 8,5 (C-31).

Theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp chiết hợp chất 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylnosta-8,26-dien-3-yl acetat (hexagonin C) từ các phân đoạn hợp chất hexagonin, trong đó phương pháp này bao gồm các bước chiết các phân đoạn chứa Hexagonin được đề cập ở trên bằng cách đưa phân đoạn F1 lên cột kích thước 60x5 cm được nhồi 200g silica gel và rửa giải bằng hệ dung môi Hexan:axeton với tỷ lệ lần lượt là 100:0, 25:1, 15:1, 10:1, 4:1, mỗi hệ dung môi 250ml, trong số 7 phân đoạn thu được, thu phân đoạn F1.6, tiếp đó sắc ký cột với hệ dung môi rửa giải hexan:axeton với tỷ lệ lần lượt 100:0, 25:1, 15:1, 10:1 và 4:1, sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylnosta-8,26-dien-3-yl acetat (hexagonin C) có công thức (I3) dạng bột không màu:



Hợp chất 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy-8,26-dien-3-yl acetat theo giải pháp hữu ích có đặc tính hóa lý như sau:

Tên theo IUPAC: 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy-8,26-dien-3-yl acetat:

Bột không màu (CHCl_3); Điểm nóng chảy $180-181^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} +57$ ($c = 0,6$, MeOH);

UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 262 (2,65) nm;

IR (neat) ν_{max} 2946, 1759, 1693, 1455, 1376, 1256, 1219, 1156 cm^{-1} ;

ESI-MS m/z 547 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100);

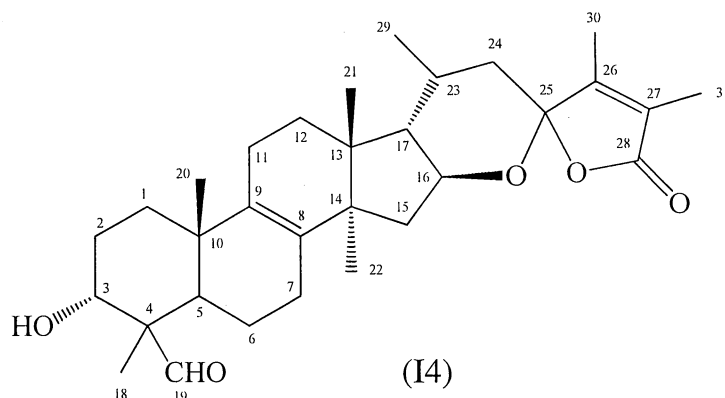
HR-ESI-MS m/z 547.3394 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ (tính toán $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{O}_5\text{Na}$ m/z 547,3399);

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, axeton- d_6) (δ ppm): 4,62 (1H, t , $J = 3,0$ Hz, H-3), 4,23 (1H, ddd , $J = 11,5$, 11,0, 5,0 Hz, H-16), 2,26 (1H, dd , $J = 14,0$, 11,0 Hz, H-15), 2,00 (3H, s , CH_3 -33), 1,96 (3H, d , $J = 1,0$ Hz, CH_3 -30), 1,75 (3H, d , $J = 1,0$ Hz, CH_3 -31), 1,45~1,30 (5H, m , H-1, -2, -23), 1,18 (1H, dd , $J = 14,0$, 5,0 Hz, H-15), 1,10 (3H, s , CH_3 -22), 1,05 (3H, s , CH_3 -20), 0,98 (3H, d , $J = 6,5$ Hz, CH_3 -29), 0,95 (3H, s , CH_3 -19), 0,88 (3H, s , CH_3 -18), 0,76 (3H, s , CH_3 -21);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, axeton- d_6) (δ ppm): 172,1 (C-28), 170,5 (C-32), 158,3 (C-26), 136,1 (C-9), 134,7 (C-8), 125,3 (C-27), 108,7 (C-25), 80,2 (C-16), 78,1 (C-3), 55,3 (C-17), 49,3 (C-14), 46,2 (C-5), 44,3 (C-13), 41,7 (C-24), 37,9 (C-10), 37,4 (C-4), 36,2 (C-15), 31,7 (C-23), 31,4 (C-1), 31,2 (C-12), 28,3 (C-22), 28,0 (C-18), 27,2 (C-11), 23,9 (C-6), 23,6 (C-2), 22,2 (C-19), 20,9 (C-33), 19,6 (C-29), 19,1 (C-20), 18,7 (C-7), 16,8 (C-21), 10,7 (C-30), 8,5 (C-31).

Theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp chiết hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy-8,26-dien-19-al (hexagonin D) từ các phân đoạn hợp chất hexagonin, trong đó phương pháp này bao gồm các bước

chiết các phân đoạn chứa hexagonin được đề cập ở trên bằng cách đưa phân đoạn F4 lên cột có kích thước 60x5 cm được nhồi 200 g silica gel và rửa giải với hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ với tỷ lệ lần lượt là 20:1, 10:1, 6:1, 4:1, 2:1, mỗi hệ sử dụng 200 ml, trong đó thu phân đoạn F4.1 và tiến hành sắc ký cột silica ge (200 gam, 60 x 3 cm) rửa giải bằng hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ thu được hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxyanosta-8,26-dien-19-al (hexagonin D) có công thức (I4) dạng bột không màu:



Hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxyanosta-8,26-dien-19-al (hexagonin D) thu được theo giải pháp hữu ích có đặc tính hóa lý như sau:

Tên theo IUPAC: 3-hydroxy-26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxyanosta-8,26-dien-19-al:

Bột không màu (CHCl_3); Điểm nóng chảy 187-188 °C; $[\alpha]_D^{25} +22$ ($c = 0,07$, MeOH);

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 247 (3,18) nm;

IR (neat) $\nu_{\max}$ 3446, 2928, 1750, 1449, 1375, 1256, 1217, 1156, 1147, 1127 cm^{-1} ;

ESI-MS m/z 519 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100), 473 (60), 457 (25), 429 (49);

HR-ESI-MS m/z 519,3083 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (theo tính toán $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{O}_5\text{Na}$ m/z 519,3086);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 9,59 (1H, *s*, CHO-18), 4,32 (1H, *ddd*, $J = 11,5, 11,5, 5,0$ Hz, H-16), 3,83 (1H, *br s*, H-3), 2,25 (2H, *m*, H-5, -15), 2,13 (4H, *m*, H-7, -11), 1,94 (3H, *d*, $J = 1,1$ Hz, CH_3 -30), 1,85 (2H, *m*, H-6, -23), 1,80 (3H, *d*, $J = 1,1$ Hz, CH_3 -31), 1,63 (3H, *m*, H-1, -6, -24), 1,50 (3H, *m*, H-1, -17, -24), 1,32 (1H, *m*, H-12), 1,21 (1H, *dd*, $J = 14,0, 5,0$ Hz, H-12), 1,10 (3H, *s*, CH_3 -22), 1,07 (3H, *s*, CH_3 -19), 1,03 (3H, *s*, CH_3 -20), 0,95 (3H, *d*, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -29), 0,69 (3H, *s*, CH_3 -21);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 209,2 (C-18), 172,3 (C-28), 157,5 (C-27), 134,8 (C-9), 134,0 (C-8), 125,1 (C-26), 108,2 (C-25), 79,5 (C-16), 72,6 (C-3), 54,5 (C-

17), 52,0 (C-4), 48,6 (C-14), 43,4 (C-13), 41,1 (C-24), 38,7 (C-5), 36,5 (C-10), 35,3 (C-15), 30,6 (C-23), 30,0 (C-12), 29,1 (C-1), 28,0 (C-22), 26,1 (C-6), 26,1 (C-2), 20,2 (C-11), 20,1 (C-7), 19,4 (C-29), 19,2 (C-20), 16,5 (C-21), 14,8 (C-19), 10,9 (C-30), 8,5 (C-31).

Các hợp chất Hexagonin A-D theo sáng chế thuộc lớp chất steroid phân cực có phổ rộng các hoạt tính sinh học thú vị như gây độc tế bào, tán huyết, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, giảm đau. Do đó, hợp chất này có thể được sử dụng để làm mẫu cho việc tổng hợp và bán tổng hợp các chế phẩm có thể sử dụng trong y, được nhằm phòng và điều trị các bệnh ung thư.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Chiết hợp chất Hexagonin từ loài nấm tổ ong lông thô (Hexagonia apiaria)

Quả thể nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria*) (8,6 kg) được thu hái và thái nhỏ và ngâm chiết 3 lần bằng dung môi metanol, tổng 8,6 lít dung môi, ở nhiệt độ phòng, thu được phần dịch chiết. Dịch chiết này được lọc bằng giấy lọc và được cất giảm áp suất bằng thiết bị quay cất chân không thu được cao metanol dạng lỏng (180g). Cao metanol này được hòa tan trong nước với lượng vừa đủ và chiết phân bố với dung môi etylaxetat, chưng cất chân không thu được hai phần: cao etylaxetat (105g) và dịch chiết nước.

Cao etylaxetat được tiến hành sắc ký cột silica gel với hệ dung môi hexan-axeton (100:0, 25:1, 15:1, 10:1, 7:1, 5:1) và hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (100:0, 6:1, 3:1, 2:1, 1:1) thu được 7 phân đoạn chính (kí hiệu từ F1 đến F7). Trong đó, các phân đoạn F1, F3 và F4 được loại bỏ dung môi, thu được các hợp chất hexagonin có công thức chung (I) tương ứng 8,6g, 2,7g và 4,7g. Hợp chất này bao gồm 4 thành phần là hexagonin A (IUPAC: 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylnosta-8,26-dien-3-yl 3-oxobutanoat), hexagonin B (IUPAC: 3-hydroxy-26-methyl-16,25:25,26-diepoxylnosta-8,26-dien-28-on), hexagonin C (IUPAC: 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylnosta-8,26-dien-3-yl acetat) và hexagonin D (IUPAC: 3-hydroxy-26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylnosta-8,26-dien-19-al) ở dạng bột.

Ví dụ 2: Chiết hợp chất 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylnosta-8,26-dien-3-yl 3-oxobutanoat (hexagonin A)

Để chiết hợp chất hexagonin A từ loài nấm tổ ong lông thô, các bước chiết được tiến hành như trong Ví dụ 1 để thu được phân đoạn F1. Tiếp đó nhồi phân đoạn F1 (8,6g) lên cột kích thước 60x5 cm được nhồi 200g silica gel và rửa giải bằng hệ dung môi Hexan:axeton với tỷ lệ lần lượt là 100:0, 25:1, 15:1, 10:1, 4:1, mỗi hệ dung môi 250ml, trong số 7 phân đoạn thu được, thu phân đoạn F1.7 và tiến hành sắc ký cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi giải hấp CH₃OH:H₂O, sau khi loại bỏ dung môi thu được 134 mg hexagonin A ở dạng bột không màu.

Ví dụ 3: Chiết hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-28-on (hexagonin B)

Để chiết hợp chất B từ loài nấm tổ ong lông thô, các bước chiết được tiến hành như trong Ví dụ 1. Tiếp đó để thu được phân đoạn F1. Tiếp đó, đưa phân đoạn F3 lên cột silica gel kích thước 60x3,2 cm được nhồi 200 g silica gel và rửa giải bằng hệ dung môi Hexan:axeton với tỷ lệ lần lượt 9:1, 6:1, 4:1 và 1:1, mỗi hệ dung môi sử dụng 250ml, trong đó thu phân đoạn F3.2 và tiến hành sắc ký cột pha đảo RP -18 với hệ dung môi giải hấp CH₃OH:H₂O, sau khi loại bỏ dung môi thu được 31 mg hợp chất hexagonin B ở dạng bột không màu.

Ví dụ 4: Chiết hợp chất 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-3-yl acetat (hexagonin C)

Để chiết hợp chất C từ loài nấm tổ ong lông thô, các bước chiết được tiến hành như trong Ví dụ 1. Tiếp đó để thu được phân đoạn F1. Tiếp đó, đưa phân đoạn F1 lên cột kích thước 60x5 cm được nhồi 200g silica gel và rửa giải bằng hệ dung môi Hexan:axeton với tỷ lệ lần lượt là 100:0, 25:1, 15:1, 10:1, 4:1, mỗi hệ dung môi 250ml, trong số 7 phân đoạn thu được, thu phân đoạn F1.6, tiếp đó sắc ký cột với hệ dung môi rửa giải hexan:axeton với tỷ lệ lần lượt 100:0, 25:1, 15:1, 10:1 và 4:1, sau khi loại bỏ dung môi thu được 5mg hợp chất Hexagonin C.

Ví dụ 5: Chiết hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-19-al (hexagonin D)

Để chiết hợp chất D từ loài nấm tổ ong lông thô, các bước chiết được tiến hành như trong Ví dụ 1. Tiếp đó để thu được phân đoạn F1. Tiếp đó, đưa phân đoạn F4 lên cột có kích thước 60x5 cm được nhồi 200 g silica gel và rửa giải với hệ dung môi CHCl₃:CH₃OH với tỷ lệ lần lượt là 20:1, 10:1, 6:1, 4:1, 2:1, mỗi hệ sử dụng 200 ml, trong đó thu phân đoạn F4.1 và tiến hành sắc ký cột silica ge (200 gam, 60 x 3 cm)

rửa giải bằng hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$, sau khi loại bỏ dung môi thu được 10 mg hợp chất hexagonin D dạng bột không màu.

Ví dụ 6. Xác định cấu trúc của các hợp chất hexagonin

Chất bột không màu thu được từ Ví dụ 2 được đưa đi xác định cấu trúc, kết quả xác được hợp chất 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-3-yl 3-oxobutanoat có đặc tính như sau:

Bột không màu (CHCl_3); Đ.n.c $184-185^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} +57$ ($c = 0,6$, MeOH);

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 262 (2,65) nm;

IR (KBr) $\nu_{\max}$ 2946, 1759, 1693, 1455, 1376, 1256, 1219, 1156 cm^{-1} ;

ESI-MS m/z 621 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 60), 605 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 26), 521 (33), 505 (100), 483 (48);

HR-ESI-MS m/z 605,3451 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (theo tính toán $\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{O}_7\text{Na}$ m/z 605,3454).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 4,71 (1H, *br s*, H-3), 4,32 (1H, *ddd*, $J = 11,5, 11,5, 5,0$ Hz, H-16), 3,72 (3H, *s*, CH_3 -35), 3,40 (2H, *s*, CH_3 -33), 2,27 (1H, *dd*, $J = 14,0, 11,5$ Hz, H-15), 2,18 (1H, *m*, H-23), 2,05 (2H, *m*, H-11), 1,94 (3H, *d*, $J = 0,5$ Hz, CH_3 -30), 1,89 (1H, *m*, H-2), 1,84 (1H, *m*, H-12), 1,81 (3H, *d*, $J = 0,5$ Hz, CH_3 -31), 1,71 (1H, *m*, H-2), 1,60 (3H, *m*, H-7, -12, -24), 1,49 (3H, *m*, H-1, -7, -24), 1,41 (3H, *m*, H-1, -5, -17), 1,20 (1H, *dd*, $J = 14,0, 5,0$ Hz, H-15), 1,08 (3H, *s*, CH_3 -22), 1,00 (3H, *s*, CH_3 -20), 0,95 (3H, *d*, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -29), 0,93 (3H, *s*, CH_3 -19), 0,88 (3H, *s*, CH_3 -18), 0,68 (3H, *s*, CH_3 -21);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 172,2 (C-28), 167,2 (C-34), 165,9 (C-32), 157,4 (C-26), 135,1 (C-9), 133,8 (C-8), 125,2 (C-27), 108,2 (C-25), 79,8 (C-16), 79,6 (C-3), 54,6 (C-17), 52,3 (C-35), 48,6 (C-14), 45,3 (C-5), 43,5 (C-13), 41,8 (C-33), 41,1 (C-24), 37,1 (C-10), 36,8 (C-4), 35,4 (C-15), 30,7 (C-23), 30,5 (C-1), 30,1 (C-12), 28,0 (C-22), 27,6 (C-18), 26,5 (C-6), 23,1 (C-2), 21,7 (C-19), 20,2 (C-11), 19,4 (C-29), 18,8 (C-20), 17,9 (C-7), 16,5 (C-21), 10,8 (C-30), 8,5 (C-31).

Chất bột không màu thu được từ Ví dụ 3 được đưa đi xác định cấu trúc, kết quả xác được hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-28-on có đặc tính như sau:

Bột không màu (CHCl_3); Đ.n.c $214-215^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} +66$ ($c = 0,2$, MeOH);

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 247 (2,35) nm;

IR (neat) $\nu_{\max}$ 3501, 2941, 1756, 1456, 1375, 1256, 1218, 1156 cm^{-1} ;

ESI-MS m/z 505 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100), 483 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 86);

HR-ESI-MS m/z 505,3290 $[M+Na]^+$ (theo tính toán $C_{31}H_{46}O_4Na$ m/z 505,3294);

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) (δ ppm): 4,32 (1H, *ddd*, $J = 11,5, 11,5, 5,0$ Hz, H-16), 3,43 (1H, *br s*, H-3), 2,26 (1H, *dd*, $J = 14,0, 11,5$ Hz, H-15), 1,94 (3H, *d*, $J = 0,5$ Hz, CH_3 -30), 1,81 (3H, *d*, $J = 0,5$ Hz, CH_3 -31), 1,19 (1H, *dd*, $J = 14,0, 5,0$ Hz, H-15), 1,06 (3H, *s*, CH_3 -22), 0,99 (3H, *s*, CH_3 -20), 0,97 (3H, *s*, CH_3 -19), 0,95 (3H, *d*, $J = 6,0$ Hz, CH_3 -29), 0,88 (3H, *s*, CH_3 -18), 0,68 (3H, *s*, CH_3 -21);

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) (δ ppm): 172,3 (C-28), 157,5 (C-26), 135,3 (C-9), 133,5 (C-8), 125,2 (C-27), 108,2 (C-25), 79,7 (C-16), 76,0 (C-3), 54,6 (C-17), 48,6 (C-14), 44,2 (C-5), 43,5 (C-13), 41,1 (C-24), 37,6 (C-10), 37,2 (C-4), 35,4 (C-15), 30,7 (C-23), 30,2 (C-1), 29,9 (C-12), 28,0 (C-22), 28,0 (C-19), 26,6 (C-6), 25,7 (C-2), 22,2 (C-18), 20,2 (C-11), 19,4 (C-29), 18,8 (C-20), 18,1 (C-7), 16,5 (C-21), 10,8 (C-30), 8,5 (C-31).

Chất bột không màu thu được từ Ví dụ 4 được đưa đi xác định cấu trúc, kết quả xác được hợp chất 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-3-yl acetat có đặc tính như sau:

Bột không màu ($CHCl_3$); Đ.n.c 180-181°C; $[\alpha]_D^{25} +57$ ($c = 0,6$, MeOH);

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 262 (2,65) nm;

IR (neat) ν_{max} 2946, 1759, 1693, 1455, 1376, 1256, 1219, 1156 cm^{-1} ;

ESI-MS m/z 547 ($[M+Na]^+$, 100);

HR-ESI-MS m/z 547.3394 ($[M+Na]^+$ (tính toán $C_{33}H_{48}O_5Na$ m/z 547,3399);

1H -NMR (500 MHz, acetone- d_6) (δ ppm): 4,62 (1H, *t*, $J = 3,0$ Hz, H-3), 4,23 (1H, *ddd*, $J = 11,5, 11,0, 5,0$ Hz, H-16), 2,26 (1H, *dd*, $J = 14,0, 11,0$ Hz, H-15), 2,00 (3H, *s*, CH_3 -33), 1,96 (3H, *d*, $J = 1,0$ Hz, CH_3 -30), 1,75 (3H, *d*, $J = 1,0$ Hz, CH_3 -31), 1,45~1,30 (5H, *m*, H-1, -2, -23), 1,18 (1H, *dd*, $J = 14,0, 5,0$ Hz, H-15), 1,10 (3H, *s*, CH_3 -22), 1,05 (3H, *s*, CH_3 -20), 0,98 (3H, *d*, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -29), 0,95 (3H, *s*, CH_3 -19), 0,88 (3H, *s*, CH_3 -18), 0,76 (3H, *s*, CH_3 -21);

^{13}C -NMR (125 MHz, acetone- d_6) (δ ppm): 172,1 (C-28), 170,5 (C-32), 158,3 (C-26), 136,1 (C-9), 134,7 (C-8), 125,3 (C-27), 108,7 (C-25), 80,2 (C-16), 78,1 (C-3), 55,3 (C-17), 49,3 (C-14), 46,2 (C-5), 44,3 (C-13), 41,7 (C-24), 37,9 (C-10), 37,4 (C-4), 36,2 (C-15), 31,7 (C-23), 31,4 (C-1), 31,2 (C-12), 28,3 (C-22), 28,0 (C-18), 27,2 (C-11), 23,9 (C-6), 23,6 (C-2), 22,2 (C-19), 20,9 (C-33), 19,6 (C-29), 19,1 (C-20), 18,7 (C-7), 16,8 (C-21), 10,7 (C-30), 8,5 (C-31).

Chất bột không màu thu được từ Ví dụ 5 được đưa đi xác định cấu trúc, kết quả xác được hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylnosta-8,26-dien-19-al có đặc tính như sau:

Bột không màu(CHCl_3); Đ.n.c 187-188 °C; $[\alpha]_D^{25} +22$ ($c = 0,07$, MeOH);

UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 247 (3,18) nm;

IR (neat) $\nu_{\max}$ 3446, 2928, 1750, 1449, 1375, 1256, 1217, 1156, 1147, 1127 cm^{-1} ;

ESI-MS m/z 519 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100), 473 (60), 457 (25), 429 (49);

HR-ESI-MS m/z 519,3083 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (theo tính toán $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{O}_5\text{Na}$ m/z 519,3086);

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 9,59 (1H, *s*, CHO-18), 4,32 (1H, *ddd*, $J = 11,5, 11,5, 5,0$ Hz, H-16), 3,83 (1H, *br s*, H-3), 2,25 (2H, *m*, H-5, -15), 2,13 (4H, *m*, H-7, -11), 1,94 (3H, *d*, $J = 1,1$ Hz, CH_3 -30), 1,85 (2H, *m*, H-6, -23), 1,80 (3H, *d*, $J = 1,1$ Hz, CH_3 -31), 1,63 (3H, *m*, H-1, -6, -24), 1,50 (3H, *m*, H-1, -17, -24), 1,32 (1H, *m*, H-12), 1,21 (1H, *dd*, $J = 14,0, 5,0$ Hz, H-12), 1,10 (3H, *s*, CH_3 -22), 1,07 (3H, *s*, CH_3 -19), 1,03 (3H, *s*, CH_3 -20), 0,95 (3H, *d*, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -29), 0,69 (3H, *s*, CH_3 -21);

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 209,2 (C-18), 172,3 (C-28), 157,5 (C-27), 134,8 (C-9), 134,0 (C-8), 125,1 (C-26), 108,2 (C-25), 79,5 (C-16), 72,6 (C-3), 54,5 (C-17), 52,0 (C-4), 48,6 (C-14), 43,4 (C-13), 41,1 (C-24), 38,7 (C-5), 36,5 (C-10), 35,3 (C-15), 30,6 (C-23), 30,0 (C-12), 29,1 (C-1), 28,0 (C-22), 26,1 (C-6), 26,1 (C-2), 20,2 (C-11), 20,1 (C-7), 19,4 (C-29), 19,2 (C-20), 16,5 (C-21), 14,8 (C-19), 10,9 (C-30), 8,5 (C-31).

Kết quả tổng hợp đặc tính lý hóa đo bằng CDCl_3 , 500 MHz được thể hiện trên Bảng 1

Bảng 1: Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR (δ , ppm) phần aglycon hợp chất hexagonin A-D

STT	Hexagonin A		Hexagonin B		Hexagonin C		Hexagonin D	
	δ_{C}	δ_{H} ($J = \text{Hz}$)	δ_{C}	δ_{H} ($J = \text{Hz}$)	δ_{C}	δ_{H} ($J = \text{Hz}$)	δ_{C}	δ_{H} ($J = \text{Hz}$)
1	30,5	1,37 (1H, <i>m</i>) 1,46 (1H, <i>m</i>)	30,2	1,48 (1H, <i>m</i>)	31,4	1,39 (1H, <i>m</i>) 1,53 (1H, <i>m</i>)	29,1	1,50 (3H, <i>m</i>) 1,63 (3H, <i>m</i>)
2	23,1	1,57 (1H, <i>m</i>) 1,85 (1H, <i>m</i>)	25,7	1,57 (1H, <i>m</i>) 1,91 (1H, <i>m</i>)	23,6	1,34 (1H, <i>m</i>) 1,61 (1H, <i>m</i>)	26,1	
3	79,0	4,57 (1H, <i>br s</i>)	76,0	3,43 (1H, <i>m</i>)	78,1	4,62 (1H, <i>t</i> , $J = 3,0$)	72,6	3,83 (1H, <i>br s</i>)
4	36,9		37,1		37,4		52,0	

5	45,2	1,39 (1H, m)	44,2	1,51 (1H, m)	46,4	1,55 (1H, m)	38,7	2,25 (1H, <i>m</i>)
6	26,5	2,00 (1H, m) 2,08 (1H, m)	26,6	2,07 (1H, m)	23,9	1,60 (1H, m) 1,94 (1H, m)	26,1	1,63 (3H, <i>m</i>) 1,85 (1H, <i>m</i>)
7	17,9	1,46(1H, m) 1,57 (1H, m)	18,1	1,54 (1H, m) 1,63 (1H, m)	18,7	1,55 (1H, m) 1,67 (1H, m)	20,1	2,13 (2H, <i>m</i>)
8	133,7		133,5		134,7		134,0	
9	135,2		135,3		136,1		134,8	
10	37,1		37,6		37,9		36,5	
11	20,2	2,02 (2H, s)	20,2	2,05 (1H, m) 2,08 (1H, m)	27,2	2,10 (1H, m) 2,20 (1H, m)	20,2	2,13 (2H, <i>m</i>)
12	30,1	1,57 (1H, m) 1,80 (1H, m)	29,9	1,60 (2H, m) 1,60 (2H, m)	31,2	1,67 (1H, m) 1,89 (1H, m)	30,0	1,21 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 14,0; 5,0 Hz) 1,32 (1H, <i>m</i>)
13	43,4		43,5		44,3		43,4	
14	48,6		48,6		46,2		48,6	
15	35,4	1,10 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =3,5; 13,5 Hz) 2,26 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 13,0; 11,5 Hz)	35,4	1,19 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =5,0; <i>J</i> =14) 2,26 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =11,5; <i>J</i> =14)	36,2	1,18 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,0; 14,0) 2,35 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 11,5; 14,0)	35,3	2,25 (1H, <i>m</i>)
16	79,5	4,13 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =4Hz)	79,7	4,32(1H, <i>m</i>)	80,2	4,23 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 11,0; 11,5; 5,0)	79,5	4,32 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 11,5; 11,5; 5,0)
17	54,3	1,46 (1H, <i>m</i>)	54,6	1,46 (1H, <i>m</i>)	55,3	1,55 (1H, <i>m</i>)	54,5	1,50 (3H, <i>m</i>)
18	27,8	0,82 (3H, s)	22,2	0,88 (3H, s)	28,0	0,88 (3H, s)	14,8	1,07 (3H, s)
19	21,8	0,90 (3H, s)	28,0	0,97 (3H, s)	22,2	0,95 (3H, s)	209,2	
20	18,9	0,97 (3H, s)	18,8	0,99 (3H, s)	19,1	1,05 (3H, s)	19,2	1,03 (3H, s)
21	16,6	0,66 (3H, s)	16,5	0,68 (3H, s)	16,8	0,76 (3H, s)	16,5	0,69 (3H, s)
22	28,2	1,03 (3H,s)	28,0	1,06 (3H, s)	28,3	1,10 (3H, s)	28,0	1,10 (3H, s)
23	30,9	2,02 (1H, <i>m</i>)	30,7	2,2 (1H, <i>m</i>)	31,7	2,13 (1H, <i>m</i>)	30,6	1,85 (1H, <i>m</i>)
24	40,8	1,56 (2H, <i>m</i>)	41,1	1,48 (1H, <i>m</i>) 1,61 (1H, <i>m</i>)	41,7	1,61(1H, <i>m</i>) 1,66 (1H, <i>m</i>)	41,1	1,50 (3H, <i>m</i>) 1,63 (3H, <i>m</i>)
25	108,2		108,2		108,7		108,2	
26	158,1		157,5		158,3		125,1	

27	124,5		125,2		125,3		157,5	
28	171,7		172,3		172,1		172,3	
29	19,5	0,93 (3H, d; J= 6)	19,4	0,95 (3H, d, J= 6)	19,6	0,98 (3H, d, J=6,5)	19,4	0,95 (3H, d, J=6,5)
30	11,0	1,90 (3H, s)	10,8	1,94 (3H, s)	10,7	1,96 (3H, d, J= 1,0)	10,9	1,94 (3H, d, J=1,1)
31	8,7	1,72 (3H,s)	8,5	1,81 (3H, s)	8,5	1,75 (3H, d, J= 1,0)	8,5	1,80 (3H, d, J= 1,1)
32	166,1				170,5			
33	41,8	3,46 (2H, s)			20,9	2,00 (3H, s)		
34	167,4							
35	52,3	3,62 (3H,s)						

Đo trong CDCl₃, 500 MHz.

Ví dụ 7. Thử nghiệm tác dụng dược lý của hợp chất hexagonin

Trong quá trình tìm kiếm các chất dẫn đường để tạo ra các loại thuốc điều trị các bệnh này thì việc nhận biết các chất có hoạt tính chống viêm là rất quan trọng là tiền đề cho việc thử nghiệm các tác dụng dược lý khác. Quá trình nhận biết các chất chống viêm tiềm năng của các hợp chất hexagonin thu được từ các ví dụ 2 đến ví dụ 6 đã được tiến hành trên các mẫu thử (độ sạch >92%). Các mẫu thử được đánh giá về tác động ức chế sự sản sinh anion superoxit và sự phóng thích elastat của bạch cầu trung tính khi đáp ứng với tác động của FMLP/CB (formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanin/cytochalasin B). Bốn hợp chất thu được từ ví dụ 2 đến ví dụ 6 được tiến hành thử nghiệm để đánh giá khả năng kháng viêm. Tác dụng ức chế của hợp chất từ *H. apiaria* lên hệ anion superoxit và phóng thích elastaza bởi bạch cầu ở người để phản ứng lại N-formyl-L-methionyl-phenylalanin/cytochalasin B (FMLP/CB) được đánh giá cụ thể như sau:

Hợp chất	IC ₅₀ (μM) ^a	
	Anion superoxit	Phóng thích elastaza
Hexagonin A	> 10	— ^b
Hexagonin B	> 10	— ^b
Hexagonin C	> 10	— ^b
Hexagonin D	5,99 ± 1,02***	> 10
LY294002 ^c	0,40 ± 0,02***	1,53 ± 0,25***

^a nồng độ cần thiết để ức chế 50% (IC50); kết quả được xác định trong khoảng $\pm$ S.D. (n = 3–4); *** p < 0,001 so sánh với giá trị đối chứng; ^bTăng hiệu ứng đã được quan sát; ^c Phosphatidylinositol-3- kinaza được sử dụng làm chất đối chứng dương.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình chiết các hợp chất hexagonin từ loài nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria*) theo giải pháp hữu ích đã chiết được hợp chất, có triển vọng để phát triển thực phẩm chức năng kháng viêm. Quy trình chiết theo giải pháp hữu ích đơn giản, dễ thực hiện mở ra một hướng mới trong việc phát triển nguồn nguyên liệu dược từ nấm, an toàn đối với người và động vật.

Các hợp chất theo giải pháp hữu ích gồm các hợp chất hexagonin từ loài nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria*). Hợp chất này thuộc lớp chất triterpenoit phân cực phổ rộng các hoạt tính sinh học thú vị, như: gây độc tế bào, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, giảm đau,... Tuy nhiên, trong tự nhiên các chất này thường tồn tại ở dạng hỗn hợp phức tạp trong dịch chiết từ nấm và rất khó để phân lập chúng thành các chất riêng biệt.

Giải pháp hữu ích này đưa ra phương pháp phân lập các chất triterpenoit phân cực rất đặc hiệu cho đối tượng nấm lớn, đặc hữu. Đồng thời, giải pháp hữu ích này cũng tạo cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các dược phẩm có tác dụng phòng và điều trị các bệnh ung thư dựa trên việc khai thác và phát triển nguồn dược liệu nấm quý.

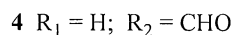
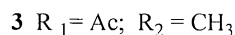
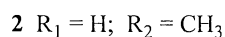
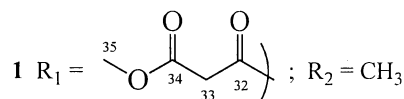
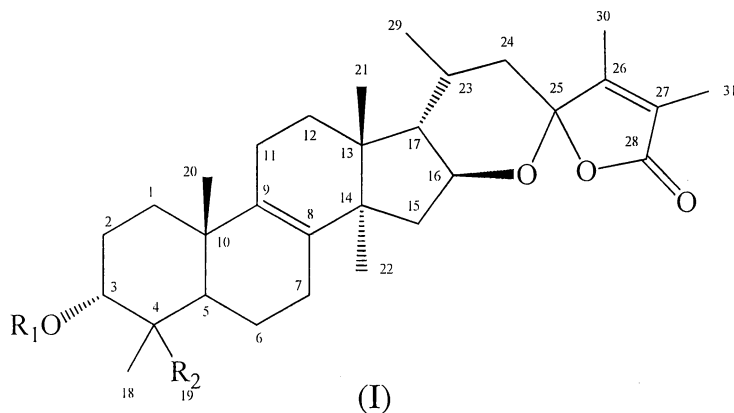
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp chiết hợp chất hexagonin có công thức chung (I) từ loài nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria*), trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) Chiết nấm tổ ong lông thô (*Hexagonia apiaria*) bằng cách thái nhỏ rồi ngâm chiết bằng metanol 3 lần theo tỷ lệ nguyên liệu (kg)/dung môi (lít) là 1/1 ở nhiệt độ trong phòng, sau đó lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm, thu được cao metanol dạng lỏng;

b) Chiết phân bố bằng etylaxetat bằng cách hòa tan cao metanol dạng lỏng vào nước và bổ sung một lượng etylaxetat tương ứng và khuấy đều, sau đó chưng cất chân không thu được cao etylaxetat;

c) Sắc ký cao etylaxetat bằng cách đưa cao etylaxetat lên cột silica gel với hệ dung môi rửa giải hexan-axeton với tỷ lệ lần lượt 100:0, 25:1, 15:1, 10:1, 7:1, 5:1 và hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ với tỷ lệ lần lượt 100:0, 6:1, 3:1, 2:1, 1:1, trong số 7 phân đoạn thu được, mỗi phân đoạn 250ml được ký hiệu từ F1-F7, thu ba phân đoạn chính F1, F3 và F4 chứa hợp chất hexagonin có công thức chung (I):



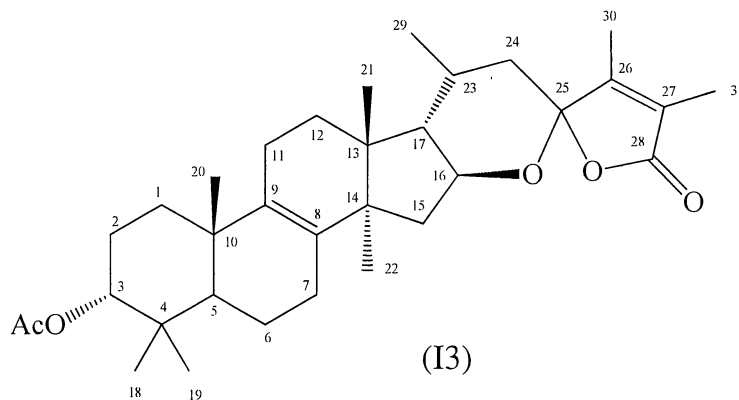
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước chiết hợp chất 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-3-yl 3-oxobutanoat bằng cách đưa phân đoạn F1 lên cột kích thước 60x5 cm được nhồi 200g silica gel và rửa giải bằng hệ dung môi hexan:axeton với tỷ lệ lần lượt là 100:0, 25:1, 15:1, 10:1, 4:1, mỗi hệ dung môi 250ml, trong số 7 phân đoạn thu được, thu phân đoạn F1.7 (hệ dung môi 4:1) và tiến hành sắc ký cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi giải hấp $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$, sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-3-yl 3-oxobutanoat có công thức (II) dạng bột không màu:



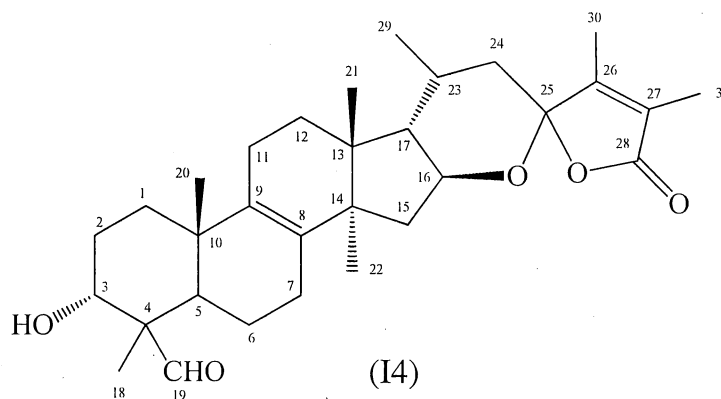
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước chiết hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-28-o bằng cách đưa phân đoạn F3 lên cột silica gel kích thước 60×3,2 cm được nhồi 200 g silica gel và rửa giải bằng hệ dung môi hexan:axeton với tỷ lệ lần lượt 9:1, 6:1, 4:1 và 1:1, mỗi hệ dung môi sử dụng 250ml, trong đó thu phân đoạn F3.2 (hệ dung môi 6:1) và tiến hành sắc ký cột pha đảo RP -18 với hệ dung môi giải hấp CH₃OH:H₂O (1:1), sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-16,25:25,26-diepoxy lanosta-8,26-dien-28-o có công thức (I2) dạng bột không màu:



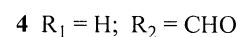
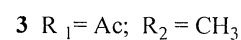
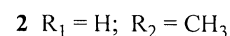
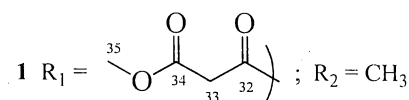
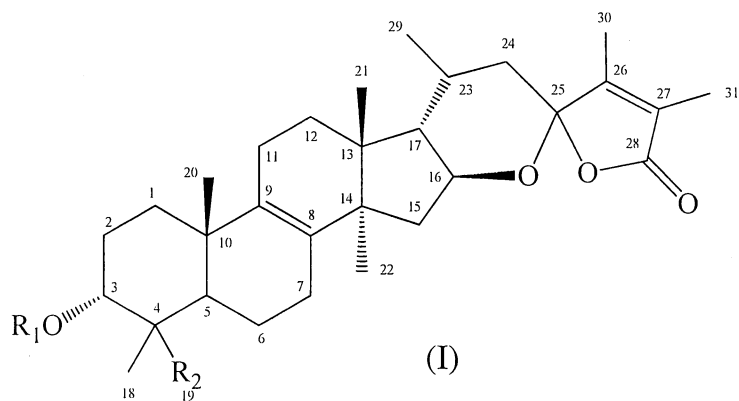
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước chiết hợp chất 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylnosta-8,26-dien-3-yl acetat bằng cách đưa phân đoạn F1 lên cột kích thước 60x5 cm được nhồi 200g silica gel và rửa giải bằng hệ dung môi hexan:axeton với tỷ lệ lần lượt là 100:0, 25:1, 15:1, 10:1, 4:1, mỗi hệ dung môi 250ml, trong số 7 phân đoạn thu được, thu phân đoạn F1.6 (hệ dung môi 4:1), tiếp đó sắc ký cột với hệ dung môi rửa giải hexan:axeton với tỷ lệ lần lượt 100:0, 25:1, 15:1, 10:1 và 4:1, sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylnosta-8,26-dien-3-yl acetat (hệ dung môi 4:1) có công thức (I3) dạng bột không màu:

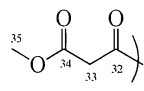


5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước chiết hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy-19-al bằng cách đưa phân đoạn F4 lên cột có kích thước 60x5 cm được nhồi 200 g silica gel và rửa giải với hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ với tỷ lệ lần lượt là 20:1, 10:1, 6:1, 4:1, 2:1, mỗi hệ sử dụng 200 ml, trong đó thu phân đoạn F4.1 (hệ dung môi 4:1) và tiến hành sắc ký cột silica gel (200 gam, 60 x 3 cm) rửa giải bằng hệ dung môi $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1), sau khi loại bỏ dung môi thu được hợp chất 3-hydroxy-26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxy-19-al có công thức (I4) dạng bột không màu:

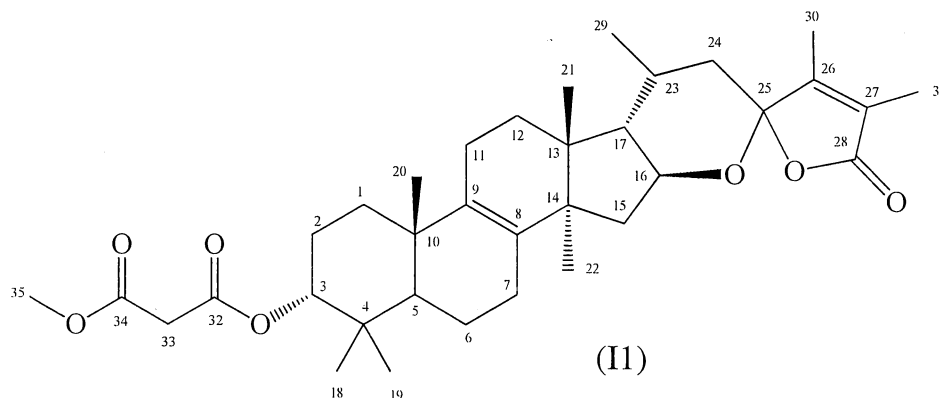


6. Hợp chất hexagonin thu được từ phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó hợp chất này có công thức (I) sau:

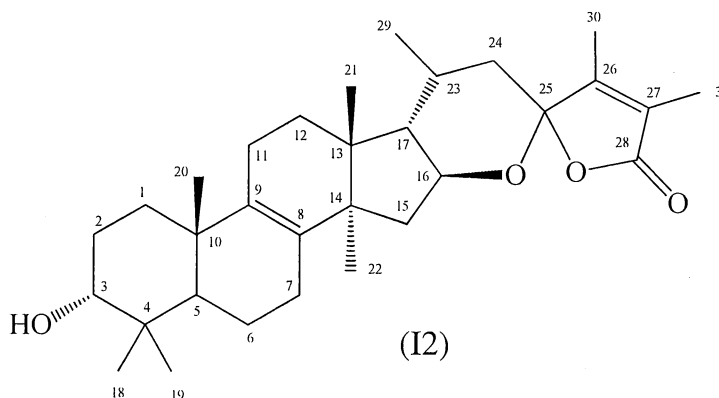


trong đó, R_1 được chọn từ nhóm bao gồm , H và Ac; và R_2 được chọn từ nhóm bao gồm CH_3 và CHO .

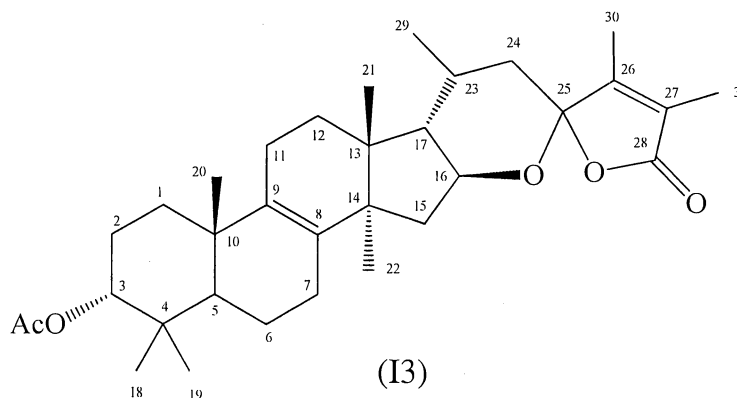
7. Hợp chất hexagonin theo điểm 6, trong đó hợp chất này là 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylanosta-8,26-dien-3-yl 3-oxobutanoat có công thức (I1):



8. Hợp chất hexagonin theo điểm 6, trong đó hợp chất này là 3-hydroxy-26-methyl-16,25:25,26-diepoxylanosta-8,26-dien-28-on có công thức (I2):



9. Hợp chất hexagonin theo điểm 6, trong đó hợp chất này là 26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylanosta-8,26-dien-3-yl acetate có công thức (I3):



10. Hợp chất hexagonin theo điểm 6, trong đó hợp chất này là 3-hydroxy-26-methyl-28-oxo-16,25:25,26-diepoxylanosta-8,26-dien-19-al có công thức (I4):

